

ARTICULOS ORIGINALES

COMPORTAMIENTO DE ANOPHELES (KERTESZIA) LEPIDOTUS ZAVORTINK,
1973, Y SU INCRIMINACION COMO POSIBLE VECTOR DE MALARIA EN EL
DEPARTAMENTO DEL TOLIMA, COLOMBIA. (1)

MARTHA L. QUIÑONES,* MARCO F. SUAREZ,* ALEJANDRO RODRIGUEZ,**
GLENN A. FLEMING,*** LUIS E. GALVIS.****

En un foco de transmisión de malaria en el Departamento del Tolima, que comprende 16 localidades de los municipios de Cunday, Villarrica, Dolores, Prado y Purificación; y donde se encuentran únicamente casos autóctonos de *Plasmodium* se realizaron estudios entomológicos desde abril de 1981 hasta mayo de 1983. Se colectaron con cebo humano 2.209 mosquitos *Anopheles*, todos del subgénero *Kerteszia*, de los cuales el 99,5% (2.209) fue *Anopheles lepidotus* Zavortink, 1973 y los restantes 10 (0,5%) *An. boliviensis* Theobald, 1905. Se concluye, con evidencia epidemiológica, que *An. lepidotus* es el posible vector en este foco. Es el primer registro conocido en que esta especie se incrimina como posible vector de malaria en Colombia. Antiguas observaciones en este foco habían incriminado como responsable de la transmisión de malaria a *An. boliviensis*, debido a confusiones taxonómicas, aclaradas en los últimos 10 años. Las más altas densidades de *An. lepidotus* ocurrieron de enero a junio y el pico de densidad precedió por cerca de 2 meses al pico de casos de malaria. Se encontró que *An. lepidotus* es altamente exófaga (3,7 veces mayor actividad de picadura fuera de las casas que dentro) y exófila (92% de las hembras que picaron, salieron sin reposar en las superficies dentro de las casas). Su hábito de picadura es diurno, con un pico de actividad entre las 15:00 y 18:00 horas. No se encontró evidencia de irritabilidad o resistencia fisiológica al DDT. Se discute la implicación de dichos resultados en relación a medidas de control de malaria y se presenta la distribución conocida hasta ahora de *An. lepidotus* en Colombia.

(1) Los conceptos expresados son responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan la opinión de la Dirección de Campañas Directas, ni de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

* Biólogos, Entomología, Dirección de Campañas Directas, Programa Antimalárico, Ministerio de Salud, Colombia. Apartado aéreo 4851, Bogotá.

** Médico, Epidemiología, Dirección de Campañas Directas. Programa Antimalárico, Ministerio de Salud, Colombia. Apartado aéreo 4851, Bogotá.

*** Entomólogo, Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Apartado aéreo 29668, Bogotá, Colombia.

**** Jefe de Zona, Programa Antimalárico, Dirección de Campañas Directas, Ministerio de Salud, Girardot, Colombia.

INTRODUCCION

Los *Anopheles* del subgénero *Kerteszia* han sido responsabilizados en la transmisión de malaria dentro de lo que se ha denominado bromelia-malaria, por ser diferentes especies de estas epifitas los criaderos de sus formas inmaduras (1, 2). en Colombia se han incriminado como vectores estacionales o potenciales a *An. (K) neivai* Howard, 1913 (3) y *An (K) boliviensis* (4, 5).

Dentro de este subgénero se ha denominado *An. boliviensis* a dos especies, *A. lepidotus* y *An. boliviensis*, por presentar similitudes taxónomicas, y mucha de la información publicada sobre la biología e importancia médica referente a esta última, pertenece a *An. lepidotus* (6).

Este trabajo presenta los resultados en un foco de malaria en el Departamento del Tolima, que muestran la presencia de las especies *An. lepidotus* y *An. boliviensis*, la incriminación de *An. Lepidotus* como posible vector de *P. vivax* aspectos de su comportamiento y los registros de su distribución en Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Descripción del área:

El foco persistente de transmisión de malaria, llamado foco "Cunday-Villarrica" esta situado a 4° de latitud norte y 74°40' de longitud oeste. Se encuentra en el departamento del Tolima, constituido por 16 localidades o veredas de los municipios de Villarrica, Cunday, Dolores, Prado y Purificación. Su ubicación se presenta en la figura 1.

El foco abarca una superficie aproximada de 100 Km², tiene 1.496 casas y 6.038 habitantes (Censo SEM 1983). Está situado sobre la franja occidental de la cordillera oriental, entre 1.000 y 1.400 msnm, con una temperatura promedio anual de 24°C y una precipitación pluviométrica anual entre los 2.000 y 4.000 mm.

Según el sistema de clasificación de Holdridge (7), el área corresponde a bosque

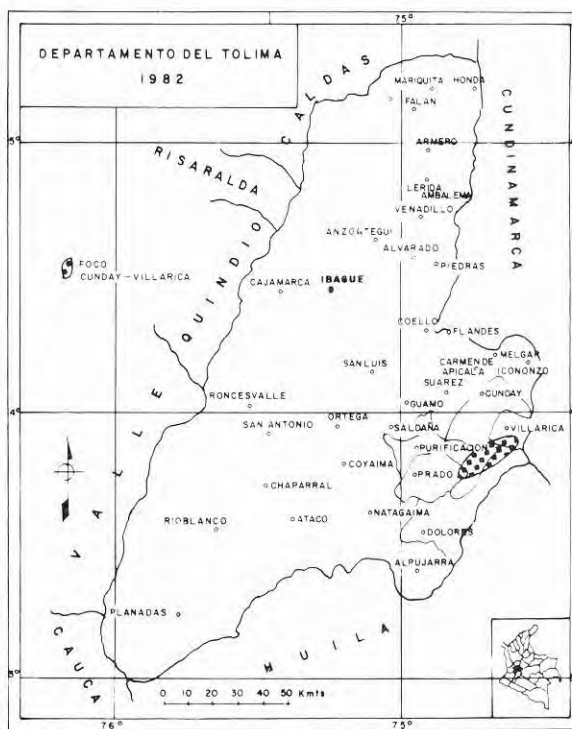


Figura 1. Ubicación geográfica del Foco de Malaria "Cunday-Villarrica", Tolima.

muy húmedo pre-montano, caracterizado por abundantes epifitas. Las bromelias encontradas en el área corresponden en su gran mayoría a la especie *Vriesea capituligera* (Grisebach) L. B. Smith, las cuales sirven de criaderos a las especies de *Anopheles (Kerteszia)*.

Su economía se basa en la explotación de madera por la tala indiscriminada de bosque y cosechas estacionales de cultivos de café, plátano y árboles frutales silvestres

Desde 1959, se ha utilizado DDT en el control de malaria, con rociamientos intradomiciliarios semestrales, además del tratamiento a los enfermos con medicamentos antimaláricos. En el foco se transmite únicamente *P. vivax*. Se han detectado casos importados de *P. falciparum*, los cuales, al realizar la investigación de la procedencia del caso, corresponden a personas procedentes de otras regiones del país.

Registro de casos de malaria:

Se llevó un registro de los casos de malaria, realizando el diagnóstico parasitológico, tratamiento a los positivos e investigación de la procedencia del caso, determinando el sitio probable de infección y clasificando los casos como autóctonos o importados (8) de otras regiones del país.

Colección de Anopheles adultos con cebo humano:

Se realizaron capturas de mosquitos *Anopheles* adultos, con cebo humano (9) en las dos localidades de más alta transmisión de malaria en el foco: Puerto Lleras y Totumal. Se utilizaron dos colectores en cada localidad, quienes realizaban las colecciones por períodos diarios de 6 horas, hasta cubrir las 24 horas del día. Con este esquema se trabajó durante 7 meses, de abril a octubre de 1981. En esta forma se obtuvo al final de cada semana información completa de las 24 horas del día. A partir de noviembre de 1981 y hasta abril de 1982, se realizaron las capturas entre las 15:00 y las 20:00 horas. En la tabulación de los datos, para presentar las fluctuaciones de densidad durante el año de estudio, se tomó este último período de tiempo. Un colector fue ubicado en el intradomicilio y el otro en el peridomicilio de las casas. Para este tipo de captura se escogieron las casas en donde hubo enfermos de malaria en los últimos 6 meses. Los mosquitos se identificaron con la clave para especies de *Anopheles* (Kerteszia) de Zavortink (6). Los resultados de las colecciones de adultos, se presentan como tasa de picadura: número de mosquitos por hombre-hora.

Hábitos de reposo intradomiciliario:

De noviembre de 1981 a mayo de 1983 se realizaron las observaciones de reposo una vez cada semana entre las 16:00 y 18:00 horas, con un total de 106 horas de observación, utilizando el método descrito por Rachou, Lewis y Moura Lima (10). Una persona, como cebo durante una hora dentro de las habitaciones humanas, se expuso a la picadura de cualquier *Anopheles* que entrara a la casa en busca de una

alimentación de sangre. Usualmente los habitantes de la vivienda se encontraban fuera de la habitación. Algunas características macroscópicas de la morfología de *An. lepidotus*, permitieron distinguir esta especie de otras, mientras se encontraban picando o en reposo. La persona quien hacía de cebo, contó el número de picaduras recibidas por *An. lepidotus* y permitió que los mosquitos finalizarán su toma de sangre, y sin ser molestados volaran a sus sitios de reposo. Una segunda persona revisó periódicamente las superficies internas de la habitación, en busca de los mosquitos en reposo. Se registró el tipo de superficie, altura desde el piso y duración del reposo.

Irritabilidad al DDT:

Se realizaron 138 pruebas de irritabilidad siguiendo el método de la OMS (9); utilizando conos plásticos, se expusieron hembras individuales vacías, a papeles impregnados con DDT 2,0% y papel control. La respuesta de los mosquitos al DDT fue evaluada de acuerdo al número de vuelos durante 15' de exposición, precedidos de 2' de adaptación. Las pruebas se efectuaron entre las 9:00 y las 12:00 horas en sitios sombreados dentro del laboratorio de campo, a una temperatura promedio de 21 °C y humedad promedio de 75%.

Susceptibilidad de adultos a DDT:

Se realizó una prueba diagnóstica (DDT 4,0% , 1 hora de exposición) en julio de 1982 usando la técnica de la OMS (11) para la detección de resistencia de mosquitos adultos. Los mosquitos fueron colectados con cebo humano en la localidad Puerto Lleras y alimentados con sangre humana.

Distribución geográfica:

Se presentan los registros de *An. lepidotus* de colecciones esporádicas con cebo humano, entre 1981 y 1983, en localidades de 9 municipios del país.

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el estudio fueron colectados con cebo humano un total de 2.209 mosquitos hembras en el foco, de los cuales 2.199

(99,5%) fueron *An. (K) lepidotus* y solo (0,5%) 10 *An. (K) boliviensis*, por lo que esta última especie no se discute más aquí. Otras especies encontradas fueron *An. argyritarsis* y *An. eiseni* en sus formas inmaduras en criaderos terrestres en colecciones esporádicas.

La especie *An. lepidotus* es la que muestra mayor y casi único contacto con el hombre en este foco.

Casos de malaria y fluctuaciones de densidades de *An. lepidotus*:

Los registros del SEM muestran una incidencia parasitaria anual de casos autóctonos, por mil habitantes de 30,3 en 1981; 14,1 en 1982 y 6,8 en 1983. El número de casos detectados y autóctonos por localidad, en estos años, se presenta en el cuadro 1.

Las variaciones de densidad de *An. lepidotus*, colectados en intradomicilio y peridomicilio, junto con los registros de casos autóctonos de malaria por mes, se presentan en la figura 2. Como se aprecia en la gráfica, en el mes de mayo de 1981, se presentó la más alta densidad registrada para *An. lepidotus* durante el estudio, con una tasa de picadura de 14,75; a partir de

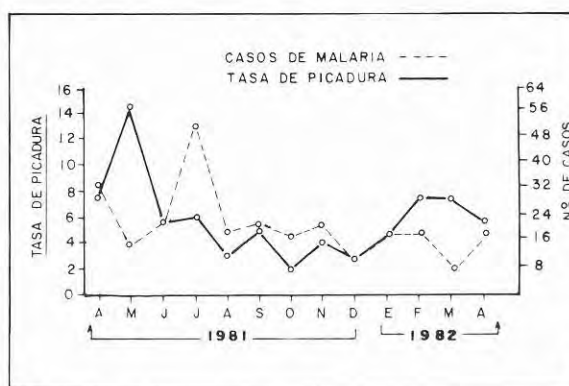


Figura 2. Fluctuaciones de densidad de *Anopheles lepidotus* y casos autóctonos de *P. vivax* por mes.

junio y hasta diciembre de 1981, la densidad muestra una tendencia a disminuir, encontrando en octubre la más baja densidad, con una tasa de picadura de 1,73. Durante los meses de enero, febrero y marzo de 1982, se registra un nuevo ascenso en la densidad de *An. lepidotus*, llegando a una tasa de picadura de 7,3 en febrero. Pareciera que las fluctuaciones de densidad tienen un comportamiento cíclico durante el año, mayor densidad durante el primer semestre (enero-junio) y una tendencia a la reducción de su densidad hacia el segundo semestre del año (julio-diciembre).

Este comportamiento estacional de la densidad de *An. lepidotus*, parece ser independiente de las lluvias; la precipitación pluvial, presentada en la figura 3, muestra variaciones que van desde 29 mm en el mes de diciembre de 1981, hasta 581 mm en noviembre del mismo año. Entre las variaciones de densidad de *An. lepidotus* y la precipitación pluvial se obtiene un índice de correlación de 0,2 ($p < 0,01$).

En la figura 2, junto con las fluctuaciones de densidad de *An. lepidotus* se presentan también las fluctuaciones de los casos de malaria con respecto al tiempo. Este comportamiento de los casos de malaria, tiende a presentar el mismo patrón de fluctuaciones que la densidad de *An. lepidotus*, con un desfase de aproximadamente dos meses. Un gran pico de casos de malaria se dio en el mes de julio (52 casos), seguramente como

CUADRO No. 1

NÚMERO DE CASOS DE MALARIA DETECTADOS Y AUTOCTONOS DE 1981 a 1983 POR LOCALIDAD EN EL FOCO DE CUNDAY - VILLARRICA, TOLIMA.

		Total Casos de Malaria					
MUNICIPIO	LOCALIDAD	Casos Detectados			Casos Autóctonos(1)		
		1981	1982	1983	1981	1982	1983
Villarrica	Berlín	13	6	3	12	4	3
	Cuatromil	12	15	7	7	7	7
	Quinde Blanco	12	9	5	7	4	3
	El Crucero	15	10	6	12	7	1
	Mesa de Galilea	16	10	0	12	8	0
	Mercadilla Alta	12	4	5	13	2	4
	Puerto Lleras	76	22	30	76	22	25
	Subdirección	13	5	1	1	3	1
	Totumal	40	30	5	25	30	6*
Cunday	Torres	21	7	4	15	7	2
Dolores	El Café	1	2	1	1	0	0
	La Palmalosa	0	0	1	0	0	2*
Prado	Altagracia #2	0	0	1	0	0	0
	Vegones	31	17	5	31	16	3
Purificación	Agua Negra	9	1	2	8	1	0
	La Esperanza	9	1	1	8	1	0
		280	139	77	228	112	57(2)

(1) Corresponden a *P. vivax*

(2) Todos investigados para confirmar la procedencia del caso.

(*) El número de casos autóctonos es mayor que el número de casos detectados, porque inicialmente fué detectado en otra localidad del foco.

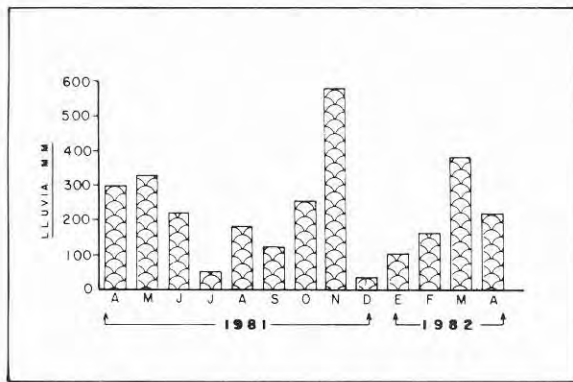


Figura 3. Registros de la precipitación pluvial del foco Cunday-Villarrica - Tolima.

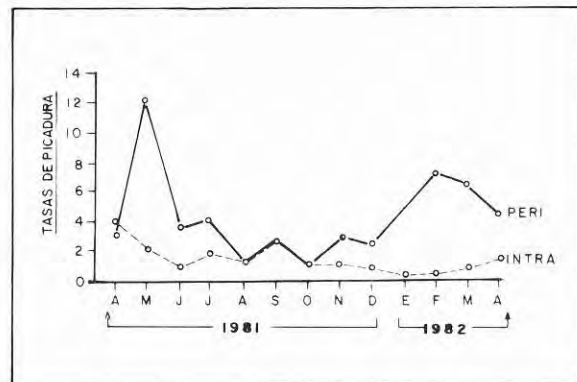


Figura 4. Dinámica de picadura de *Anopheles lepidotus* en el intradomicilio y peridomicilio.

resultado del ascenso en la densidad de *An. lepidotus* entre mayo y junio. Si se desplazan los datos del número de casos de malaria 2 meses, haciendo coincidir el pico del número de casos, con el pico de densidad de *An. lepidotus*, se obtiene un índice de correlación de 0.9 ($p < 0.01$), lo que sugiere una estrecha relación.

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, señalamos a *An. lepidotus* como el posible vector de malaria en éste foco. La experiencia con otras especies de *Anopheles* en las Américas, vectores reconocidos y en situaciones epidémicas, ha demostrado que encontrar la evidencia directa, esporozoitos en las glándulas de la saliva, es de muy poca efectividad. Han sido necesarias 5.391 disecciones en 18 meses de trabajo, para encontrar 2 glándulas positivas de *An. albimanus* (0.03%) (10), y 5.832 disecciones de *An. darlingi* para obtener 40 (0.6%) con esporozoitos (12). Por esta razón, consideramos suficiente la evidencia epidemiológica, para incriminar a *An. lepidotus* como el posible vector de malaria.

Dinámica de picadura dentro y fuera de las casas:

En la figura 4 se presentan, comparativamente, las tasas de picadura de *An. lepidotus* en el peridomicilio y en intradomicilio. Las fluctuaciones de densidad presentan un comportamiento diferencial,

mostrando una marcada tendencia a picar más fuera de las casas que dentro. La tasa de picadura general en el peridomicilio fue 4.57, mientras en el intradomicilio fue 1.24; 3.7 veces mayor actividad de picadura fuera de las viviendas. En el intradomicilio el comportamiento de *An. lepidotus* presenta una tendencia más estable, mientras en el peridomicilio se presentan grandes fluctuaciones de densidad a lo largo del año de observación.

Ciclo diario de picadura:

El ciclo diario de picadura durante 24 horas se presenta en la figura 5. *An. lepidotus* muestra un pico de actividad entre las 15:00 y 18:00 horas con mayor intensidad alrededor de las 17:00 horas. Su actividad durante la noche es casi nula (1 mosquito colectado durante el estudio). Presenta luego un incremento de su actividad hacia las 6:00 horas en mucha menor amplitud que al atardecer, presentando el mismo patrón de actividad de picadura, tanto dentro de las casas como fuera. Este patrón de actividad diurna coincide con descripciones de otras especies del mismo subgénero (3, 6). *An. lepidotus* pica tanto dentro como fuera de las viviendas, pero teniendo en cuenta la densidad, los hábitos y el horario de picadura, el riesgo de las personas de entrar en contacto con el anofelino y por lo tanto de adquirir la enfermedad, es mayor en el peridomicilio.

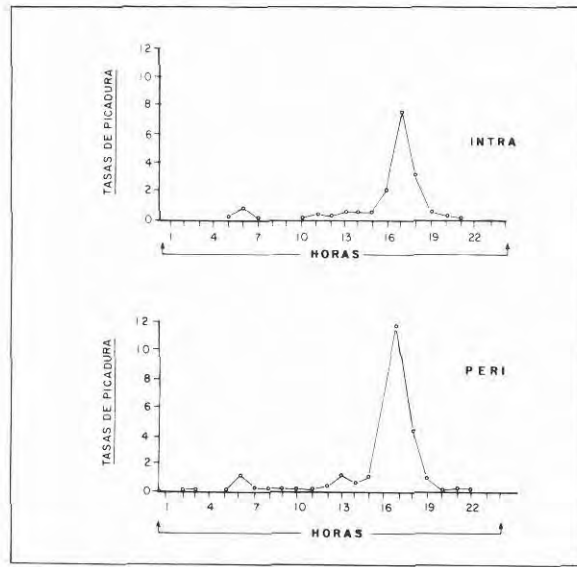


Figura 5. Registro del ciclo diario de picadura de *Anopheles lepidotus* durante las 24 horas.

Reposo intradomiciliario:

Se observaron picando un total de 184 hembras de *An. lepidotus* de las cuales 176 hembras (92%), se vieron salir de las habitaciones una vez terminaron su comida de sangre. Solamente 8 (4%) de estas hembras llenas se encontraron en reposo: 6 reposaron en el piso; 1 se encontró en una pared de madera a 2 m de altura, reposó durante 20' y otra fue encontrada reposando durante 30' en una pared de bahareque a la misma altura de la anterior. No se encontraron hembras vacías en reposo. Acorde con lo observado para otras especies de *Anopheles* (*Kerteszia*) (13); *An. lepidotus* muestra una marcada tendencia a la exofilia, evadiendo así cualquier contacto con las superficies rociadas con insecticidas dentro de las casas.

Irritabilidad al DDT:

De los 15' de observación en cada prueba se obtuvo un promedio de 1,5 vuelos en los mosquitos expuestos al DDT y de 1,4 vuelos en los controles. Esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$), en la prueba de Fisher para análisis de variancia. Las pruebas de irritabilidad muestran que la exofilia de *An. lepidotus* no se debe a la

presencia del DDT dentro de las habitaciones.

Susceptibilidad de adultos al DDT:

Se probaron 92 *An. lepidotus*, con mortalidad del 100% después de una hora de exposición al insecticida y 0% de mortalidad en los controles. Aunque *An. lepidotus* muestra susceptibilidad al DDT, su comportamiento exofílico y exofágico es lo que ha limitado el éxito de la medida de control con rociamiento intradomiciliario con DDT.

Registro de *An. lepidotus* en Colombia:

En el cuadro 2 y la figura 6 se presentan los registros de distribución de *An. lepidotus* en Colombia, colectados picando al hombre. Hasta el momento los hallazgos han sido en el pie de monte cordillerano, principalmente

CUADRO No.2

REGISTROS DE *ANOPHELES LEPIDOTUS* DE COLOMBIA (1)

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	LOCALIDAD
Caqueta	Florencia	El Diamante
Cundinamarca	Medina	Choapal Los Alpes Las Palmeras Periquito San Miguel
Magdalena	Santa Marta	Ciudad Perdida
	Carretera de Fundación	a Santa Marta
Tolima	Icononzo	Alto de Icononzo Dos Quebradas Guamitos Guatimbol La Fila La Laja Naranjal Parroquia Vieja San Jose Valencia
	Cunday	Torres
	Dolores	El Café Palmasola
	Prado	Altagracia # 2 Vegones
	Purificación	Agua Negra La Esperanza
	Villavieja	Berlín Cuatro Mil Cunde Blanco El Crucero Mesa de Galilea Meccadilla Alta Puerto Lleras Subdirección Totumal

(1) Colecciones de adultos con cebo humano de abril de 1981 a agosto de 1983.

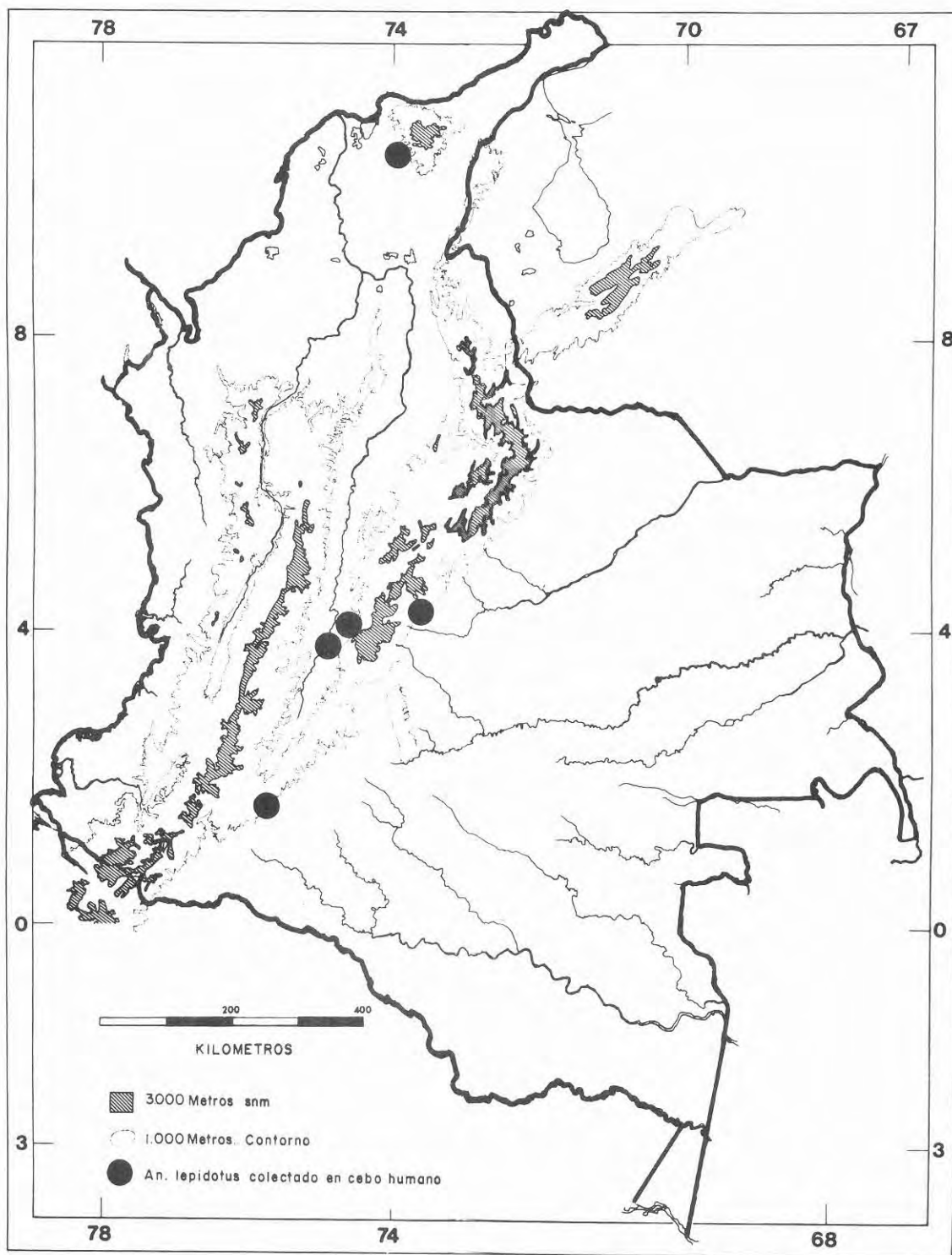


Figura 6. Distribución conocida de *Anopheles lepidotus* en Colombia.

en la cordillera oriental. En el municipio de Icononzo, Departamento del Tolima, donde se ha encontrado *An. lepidotus* como la única especie de *Anopheles* presente, con tendencia antropofílica, parece también estar implicada con la transmisión de *P. vivax*.

Es necesario ampliar el conocimiento sobre la distribución de *An. lepidotus* y su relación con malaria en diferentes áreas del país, porque donde esta especie sea la responsable de la transmisión de malaria, las medidas de control deben seleccionarse cuidadosamente. Una alternativa para realizar medidas de control de malaria en este foco u otros focos similares, dirigidas al vector, podría ser utilizar un insecticida de fuerte acción fumigante aplicado en el peridomicilio de las viviendas. La constante vigilancia epidemiológica, con diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado de los casos de malaria, es en este momento la alternativa de elección para manejar el problema en focos similares en el país.

SUMMARY

Entomological studies were made of a focus of *P. vivax* malaria in the municipalities of Cunday, Villarrica, Dolores, Prado and Purificación, Department of Tolima, during april 1981 to may 1983. Of 2,209 anopheline mosquitoes collected from human bait all were of the subgenus *Kerteszia*, 99.5% of which were *An. (K) lepidotus* and the remainder *An. (K) boliviensis*. Therefore, it was concluded that *An. lepidotus* is the vector in this focus; this in the first report of this species being incriminated as a malaria vector in Colombia. Earlier observations in this focus had incriminated *An. boliviensis* due to taxonomic confusion which has been only clarified in the last 10 years. Highest *An. lepidotus* densities occurred during January to June and peak *An. lepidotus* density preceded peak malaria cases by about 2 months. *An. lepidotus* was found to be highly exophagic (3.7 times more human biting activity outdoors than indoors) and exophilic (92% of those feeding indoors left the house without resting). Human biting is almost totally diurnal with peak

biting activity between 15:00 and 18:00 hours. No evidence was found of irritability or physiological resistance to DDT. Implications of the above results in relation to malaria control measures are discussed and the present known distribution of *An. lepidotus* in Colombia is given.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Oswaldo Caliz Peña, Director del SEM, por su continuo respaldo; a los funcionarios del Grupo de Entomología, señores Baudelino Díaz, Adriano Díaz, Nazario Campos, Jorge Torres, Augusto Suárez y Fernando Cruz, quienes hicieron posible la colección de los datos de campo; al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, por la identificación de las muestras botánicas; al doctor Michael Nelson, por sus valiosos comentarios durante el desarrollo del trabajo y la revisión del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Coutinho, J. O.; Rachou, R. G. e Ricciardi, I. Contribucao para o conhecimento dos transmissores da malaria no Brasil A (*K. cruzii*) e A (*K. bellator*). Arquiv. Hig. 1943, 13: 115-127.
2. Downs, W. G. and Pittendrigh, C.S. Malaria transmitted by bromeliad-breeding anophelines. pp 736-748. In Boyd, M.F., Malariology, W. B. Saunders Co., Philadelphia & London. 1949. Vol. 1.
3. Rey, H. Revista de nuestros conocimientos sobre vectores de malaria en Colombia. Tijeret. S. Malaria, 1947, 11: 30-32.
4. Ferro, V. Revisión de los recursos aplicables a la lucha contra el paludismo. Rev. ENSP (Medellín). 1979, 5(1): 11-18.
5. Komp, W. H. W. and Osorno, M. E. The male and larva of *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* Theobald Ann. Entomol. Soc. Am. 1963, 29: 415-419.
6. Zavortink, T. J. A review of the Subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Contrib. of the Am. Entomo. Inst. 1973, 9(3): 1-54.

COMPORTAMIENTO DE ANOPHELES (KERTESZIA) LEPIDOTUS ZAVORTINK. 1973,....

7. ICAG. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Zonas de vida y formaciones vegetales de Colombia, 1977, 13(11): 106-114. Bogotá, Colombia.
8. Organización Mundial de la Salud. Terminología del Paludismo y de la Erradicación del Paludismo. Ginebra 1964, 161 pp.
9. WHO, Manual on Practical Entomology in Malaria, 1975, Part II. 191 pp.
10. Rachou, R. G.; Schinazi, A. L. and Moura Lima, M. An intensive epidemiological study of the causes for the failure of residual DDT-spraying to interrupt the transmission of malaria in Atalaya and Falla, two villages on the coastal plain of El Salvador, Central America. Res. Bras. de Mal. e Doencas Trop. 1973, 25(1-4): 5-293.
11. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitos to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - Diagnostic test. 1981, WHO/VBC/81. 806 (documento mimeografiado).
12. Horsfall, W. R. Mosquitoes, their bionomics and relation to disease. The Ronald Press Company, New York, 1955, 723 pp.
13. Forattini, O. P.; Correa, R. R.; Rabello, E. X. e Guarita, O. Algunas observacoes sobre a densidade de anofelinos *Kerteszia* no estado de Sao Paulo, Brasil. Arquiv. Hig. Saude Pub. 1961, 26: 246-256.